

검은콩 청국장 추출물이 3T3-L1 지방세포와 고지방식이를 급여한 마우스의 항비만효과에 미치는 영향

장영선¹ · 정종문^{2*}

¹(주)벤스랩 중앙연구소

²수원대학교 생명과학과

Anti-obesity Effects of Black Bean *Chungkugjang* Extract in 3T3-L1 Adipocytes and Obese Mice Induced by High Fat Diet

Young-Sun Jang¹ and Jong-Moon Jeong^{2*}

¹Technology Research Center, Ben's Lab Co., Ltd., Gyeonggi 445-743, Korea

²Dept. of Life Science, The University of Suwon, Gyeonggi 445-743, Korea

Abstract

In this study, we investigated the antioxidative activity (scavenging activity of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical and superoxide anion radical) and anti-obesity effects of black bean *chungkugjang* extract (BBCE). DPPH free radical-scavenging activity and superoxide anion radical-scavenging activity (SC₅₀ value) of BBCE were 162.7±2.8 ppm, and 205.62±3.6 ppm, respectively. The anti-obesity effects of BBCE were investigated by measuring Oil Red O staining in 3T3-L1 adipocytes. BBCE reduced the content of Oil Red O dye in 3T3-L1 adipocytes. We also examined the effects of BBCE on adiposity, serum lipid, and leptin levels in obese mice fed a high-fat diet. Mice were fed the BBCE experimental diets for 7 weeks, after which they were sacrificed. ICR male mice were randomly divided into three groups, one normal diet group (ND group) and two high fat diet groups with or without BBCE supplementation (HFD group and HFD-BBCE group). The results showed that weight gain and the food efficiency ratio significantly decreased upon addition of BBCE compared to those of the HFD group. Further, white adipose tissue weights of epididymal, mesenteric, and retroperitoneal areas in the HFD-BBCE group were reduced to 34.8%, 7.1%, and 40.6%, respectively, compared to that of the HFD group. The serum levels of triglycerides, total cholesterol, LDL-cholesterol, and leptin in the HFD-BBCE group were significantly lower than those of the HFD group. Based on these results, it can be concluded that BBCE may have beneficial effects on reducing fat mass and serum lipid content.

Key words: chungkugjang, anti-obesity, 3T3-L1, cholesterol, body fat

서 론

우리나라는 최근 10년간 성인 1인당 열량 섭취에서 지방의 비율이 약 16.4%로 높아졌고 아울러 하루섭취 열량은 권장량의 113.75%에 해당되며, 이러한 열량의 초과 때문에 비만, 뇌졸중, 동맥경화증, 고혈압, 당뇨 등의 각종 퇴행성 질병이 증가되고 있다(1). 특히 고도비만은 당뇨, 심혈관질환, 고혈압, 고지혈증 등 심각한 성인병을 유발하기도 하고, 각종 암의 발생빈도를 증가시키므로 비만은 수명단축의 주요 원인이 될 수 있다(2). 이러한 추세로 보아 지방질의 과잉섭취로 인한 비만 및 심혈관계 질환의 예방이나 질환에 대한 개선 효과가 있는 식품개발이 필요해짐에 따른 연구가 많이 이루어지고 있다. 특히 한국의 전통발효 식품은 이러한 질병의 예방에서 큰 역할을 할 수 있는 가능성이 있을 것으로

기대되고 있다.

청국장은 된장, 간장과 함께 우리나라 전통장류 중의 하나로 담금 시간과 방법이 짧고 간단한 속성 콩 발효식품이며 특별한 부작용이 없는 식품으로 알려져 있고, 미생물, 효소, 다양한 생리활성물질 등이 풍부하며(3), 인체의 균형을 잡아 주어 건강을 유지, 증진시켜 준다(4). 전통 청국장은 건조한 벧짚이나 콩의 종피에 많이 서식하고 있는 고초균(*Bacillus subtilis*)을 포함한 *Bacillus*속 세균들이 원료 콩의 단백질과 당질을 주도적으로 발효시켜 소화흡수율을 증진시키고, 독특한 풍미와 점질물을 형성하며 각종 효소와 박테리오신을 포함한 기능성 물질을 생산한다. 청국장에서는 항산화 효과(5), 혈전용해 효과(6), 혈압강하 효과(7) 및 골다공증 억제, 동맥경화, 심장병, 당뇨병 예방 효과와 항암효과 및 각종 성인병을 예방하는 효과가 있다고 알려져 있다(8,9).

*Corresponding author. E-mail: jmjeong@suwon.ac.kr
Phone: 82-31-222-6514, Fax: 82-31-222-6552

청국장 발효과정에서 생성된 끈적끈적한 점질물은 글루탐산의 γ -카르복시기와 α -아미노기가 아마이드 결합된 γ -폴리펩타이드로 미생물에 의해서 생산되는 아미노산계 폴리머인 폴리글루탐산(γ -polyglutamic acid, γ -PGA)이다. 지금까지 *Natrialba aegyptiaca*, *Bacillus acthracis*, *Bacillus magaterium*, *Bacillus licheniformis* 등의 균주가 생산하는 것으로 보고되고 있으나, 대두 발효 미생물인 *Bacillus subtilis*에 의해서 생성되는 γ -PGA가 가장 일반적이다(10). γ -PGA의 보고된 효능으로는 면역 기능 증강, 세포내 세균 및 바이러스 감염에 대한 억제효능 및 암세포 사멸 효과, 세포벽보호 및 항산화 효과, 칼슘 흡수 촉진 등이 있으며 보습성이 뛰어나 식품뿐만 아니라 화장품 소재로도 각광받고 있는 기능성 소재이다(11).

한편, 민간에서 약콩이라고 전해지는 검은콩은 대두보다 많은 양의 isoflavone을 함유하고 있는데, 특히 이중 genistein은 유해한 활성 산소종을 제거하여 항산화 효과를 나타내며(12), 암세포가 면역시스템에 의한 공격을 피해 살아남을 수 있게 도와주는 heat shock protein(HSP), glucose-related protein(GRPs)과 같은 스트레스 단백질 생성을 저해함으로써 유방암, 직장암, 전립선암 등에 대한 항암작용을 나타내는 것으로 알려져 있다(13). 청국장 발효에 있어서 검은콩은 대두에 비하여 종피가 두껍고 육질에 견고하게 부착되어 있으며, 내부조직이 약간 단단하므로 증자할 때 팽윤도와 발효할 때 콩단백질의 분해율이 낮을 뿐만 아니라, 종피에 항균성 물질이 존재하여 발효도가 낮다. 주로 쌀, 보리, 잡곡과 혼합하여 밥밀콩으로 사용되거나 자반용 콩으로 사용되며, 일부는 떡소, 제과용, 약콩으로 이용되고 있지만, 간장, 된장, 청국장 등의 장류제조에는 많이 이용되지 않고 있다(14).

따라서 청국장은 주로 대두로 제조되어 왔기 때문에 검은콩을 이용한 청국장의 제조에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 그러므로 본 연구를 통해 대두에 비하여 기능성이 우수한 검은콩을 청국장 대표 균주인 *Bacillus subtilis*를 접종하여 발효시켜 청국장을 제조하였으며 이를 추출하여 그 효과를 극대화 하였다. 이에 따라 생산된 검은콩 청국장 추출물을 3T3-L1 지방세포에 처리하여 지방축적저해 작용을 통해 항비만 효과를 확인하였으며, 고지방 식이로 비만을 유도한 흰쥐에 일정농도로 급여하여 체중, 혈중 지질 분석과 함께 복부 및 기타 지방 조직 측정 등을 통해 비만에 관련된 몇 가지 생화학적 지표를 조사하여 체중 조절 및 체지방 개선효과를 갖는 건강기능성 식품으로서의 유용성을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 기기

검은콩은 중국산 서리태를 구입하여 사용하였으며, 청국장 발효에 사용한 균주는 한국미생물보존센터(Seoul, Ko-

rea)에서 *Bacillus subtilis*(KCCM12248)를 분양받아 사용하였다. 3T3-L1 cell은 ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)로부터 구입하였다. 실험에 사용한 fetal bovine serum(FBS), Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM)은 GIBCO사(Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며, insulin, dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMx), Oil Red O, formaldehyde, isopropyl alcohol 등의 시약은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 그 이외의 시약은 1급 또는 특급을 사용하였다. 중성지방 측정용 시액(Cleantech TG-S) kit, 총 콜레스테롤 측정용 시액(T-CHO) kit, HDL-콜레스타제(HDL-CHO) kit는 아산제약(Gyeonggi, Korea)에서 구입하였고, 펩틴 측정용 kit는 RayBiotech사(Norcross, GA, USA)에서 구입하였다.

흡광도 측정에 사용된 UV-VIS 흡광계는 Spectronic Genesys 5(Milton Roy, Ivyland, PA, USA) 모델을 사용하였으며, ELISA microplate reader기는 VersaMax(Molecular Devices, San Francisco, CA, USA)를 사용하였다.

검은콩 청국장 추출물의 제조

한국미생물보존센터에서 분양받은 *Bacillus subtilis*를 nutrient broth(beef extract 0.3%, peptone 0.5%)에서 37°C, 18시간 배양한 배양액을 8,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 cell pellet을 분리하였다. 서리태는 세척하여 가압증자기(HS-9041, Hahn Shin Scientific, Gyeonggi, Korea) 121°C에서 30분간 삶은 다음 충분히 식혔다. 삶은 서리태에 분리한 cell pellet을 서리태 무게의 0.1%가 되도록 접종하였다. 접종 후 40°C에서 72시간 발효시켜 검은콩 청국장을 제조하였다. 검은콩 청국장에 증류수를 1:2의 비율로 넣고 25°C에서 24시간 동안 교반배양기(DA-SI-LL, DongA Scientific, Gyeonggi, Korea)에서 교반 추출하였다. 이를 filter paper(Whatman No. 42)를 사용하여 거른 후 여과액을 60°C에서 감압진공농축(R-114, Buchi, Flawil, Switzerland)하여 분말 형태로 제조하였다(80 mesh).

DPPH free radical 소거효과 측정

검은콩 청국장 추출물의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) free radical 소거효과를 확인하기 위하여 Yasushi 등(15)의 문헌을 변형하여 실험하였다. 0.2 mM 농도가 되도록 에탄올에 용해한 DPPH를 1.5 mL, 최종농도 15~250 ppm이 되도록 농도별로 용해한 검은콩 청국장 추출물 0.15 mL, 증류수 1.35 mL을 첨가하여 30분 동안 상온에서 반응시킨 후, 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH free radical 소거효과(%)는 $(1 - (\text{시료를 첨가한 반응군의 흡광도} / \text{시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도})) \times 100$ 식으로부터 구하였다. 그 결과는 50% radical 소거효과를 나타낼 때의 sample 농도 즉, 50% scavenging concentration(SC₅₀) 값으로 나타내었다. 양성대조군으로 epigallocatechin gallate(EGCG)와

항산화제로 알려진 ascorbic acid를 최종 농도 0.5~5 ppm이 되도록 실험하였다.

Superoxide anion radical 소거효과 측정

검은콩 청국장 추출물의 superoxide anion radical 소거효과 측정은 nitro blue tetrazolium(NBT) 환원법(16)을 이용하여 측정하였다. 최종 농도 30~500 ppm이 되도록 농도별로 용해한 검은콩 청국장 추출물 0.05 mL, 발색액(0.4 mM xanthine, 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 8.0), 0.24 mM nitro blue tetrazolium) 0.5 mL, 효소액(0.048 unit/mL xanthine oxidase, 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 8.5)) 0.5 mL을 첨가하고 잘 혼합하여 37°C에서 20분 동안 반응시킨 후, 70 mM sodium dodecyl sulfate(SDS) 1 mL을 첨가하여 효소 반응을 정지시켜 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성 측정결과를 통해 superoxide anion radical 소거효과(%)를 다음과 같은 식으로부터 구하였으며, 그 결과는 SC₅₀값으로 나타내었다. 양성대조군으로 사용한 EGCG와 ascorbic acid는 최종 농도 1~10 ppm이 되도록 실험하였다. (1-(시료를 첨가한 반응군의 흡광도/시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도))×100

3T3-L1 adipocyte의 배양

3T3-L1 cell은 American Type Culture Collection로부터 구입하였다. 세포는 10% FBS이 포함된 DMEM을 사용하여 75T-flask에서 5% CO₂, 37°C incubator에서 배양하였다. 3~4일 후 세포가 confluent하게 되면 0.05% Trypsin/0.53 mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)를 처리하여 세포를 분리하고 원심분리기(1,500 rpm, 5 min)에서 세포를 모은 후 세포밀도를 1×10⁴ cell/mL로 희석하여 12 well plate에 1 mL씩 plating 하여 배양하였다. 2일에 한번씩 10% FBS가 포함된 새로운 DMEM 배양액으로 바꿔 주었다. 3~4일 후 세포가 confluent하게 되면 이를 후에 DMEM 배양액에 5 mg/mL insulin, 0.25 mM dexamethasone, 0.5 mM IBMX가 첨가된 differentiation medium을 처리하여 분화를 유도하였다. 2일 후에는 5 mg/mL insulin만 포함된 배양액으로 교환하고 2일에 한 번씩 새 배양액으로 갈아주면서 분화를 유도하였다(17). 6일째에는 insulin이 함유되어 있지 않은 배양액으로 세포를 배양한 후 7일째에 시료를 처리하고 24시간 후에 Oil Red O 염색을 실시하였다.

세포독성 측정

세포 생존율의 측정을 위한 methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide(MTT) assay는 Sladowski 등의 방법(18)을 따라 행하였다. 배양시킨 3T3-L1 세포를 96 well plate에 1×10⁵ cell/well로 분주하여 16~18시간 배양한 후 농도별로 희석한 검은콩 청국장 추출물을 24시간 처리하였다. 5 mg/mL로 용해한 MTT용액을 10 µL/990 µL medium으로 첨가한 후 5% CO₂, 37°C에서 3시간 배양하였다. 배양이 끝난 다음 배양액을 제거한 뒤 DMSO 200 µL/well로 넣

고 20분간 교반하여 ELISA reader로 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Oil Red O 염색

세포 배양액을 버리고 세포를 고정시키기 위해 10% formaldehyde를 500 µL씩 각 well에 넣고 4°C에서 1시간 동안 배양하였다. 그 후에 formaldehyde를 버리고 PBS로 세 번 씻어낸 후 Oil Red O 염색약(Oil Red O 0.25 g을 isopropyl alcohol 50 mL에 녹인 용액을 증류수와 3:2의 비율로 섞은 후 0.45 µm filter로 여과한 용액)을 500 µL씩 넣고 다시 상온에서 1시간 동안 염색한 후 PBS로 3번 씻어내었다. 염색이 된 세포는 현미경으로 관찰하였으며, 관찰 후 well당 500 µL의 isopropyl alcohol로 지방세포 내 염색된 염색약을 추출하여 spectrophotometer로 520 nm에서 OD값을 측정하였다(19).

실험동물 및 식이

ICR계 마우스(웅성, 6주령)는 (주)오리엔트바이오(Gyeonggi, Korea)에서 구입하여 1주간 적응시킨 뒤 실험에 사용하였다. 실험 기간 중에 물과 사료는 자유로이 섭취시켰으며, 사육실 온도는 22±2°C, 습도는 55±5%, 명암은 12시간 주기로 자동 조절하였다. 실험군은 정상식이군(normal diet, ND군), 고지방식이 대조군(high fat diet, HFD군), 고지방식기와 검은콩 청국장 추출물 5% 첨가군(high fat diet+5% black bean chungkugjang extract, HFD-BBCE군)으로 구분하였다. 시험군은 고지방식이로 7주간 비만을 유도하였고, 체중은 시험물질 급여 개시 직전 및 급여 개시 후 주 2회, 식이섭취량은 주 2회씩 측정하였다. 실험에 사용된 식이는 샘타코(Samtako)사(Gyeonggi, Korea)에서 판매하는 NIH#31M 가루식이에 전분 15%를 첨가하여 일반식이를 제조하였으며, NIH#31M 가루식이에 전분 15%, 돈지(lard) 5%, cholesterol 0.1%, casein 5%를 첨가하여 고지방식이를 제조하였고, 고지방식이에 casein 대신 검은콩 청국장 추출물 분말 5%를 첨가하여 검은콩 청국장 추출물 첨가식이를 조제하였으며, 자세한 조성비는 Table 1과 같다.

혈액채취 및 혈청 검사

마우스의 혈청 내 중성지방, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 렙틴을 측정하기 위해 24시간 절식 후 흰쥐를 에틸에테르로 마취한 후 심장 채혈하여 얻은 혈액을 상온에서 20분간 방치한 뒤 8,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 -20°C에서 보관하며, 중성지방, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, 렙틴 측정용 kit를 사용하여 각각 측정하였다. LDL-콜레스테롤 함량은 Friedewald 식에 의하여 계산하였다(20). LDL콜레스테롤=총콜레스테롤-(HDL콜레스테롤+중성지방/5).

지방조직의 무게 측정

채취한 지방조직의 무게를 조사하기 위하여 혈액을 채취

Table 1. Compositions of experimental diet for the animal study (%)

Diet composition	ND	Experimental diet	
		HFD	HFD-BBCE ²⁾
NIH#31M ¹⁾	85	74.9	74.9
Lard	—	5	5
Corn starch	15	15	15
Cholesterol	—	0.1	0.1
Casein	—	5	—
BBCE ²⁾	—	—	5
Total	100	100	100

¹⁾NIH#31M: Ground whole wheat 35.2%, ground whole yellow corn 20%, ground whole oats 10%, wheat middlings 10%, fish meal (60% protein) 9%, soybean meal (47.5% protein) 5%, soybean oil 2.5%, alfalfa meal (17% protein) 2%, dicalcium phosphate 1.55, brewer's dried yeast 1%, ground limestone 0.5%, salt 0.5%, vitamin premix 0.25%, mineral premix 0.25%, choline chloride 0.135, L-lysine 0.1%, DL-methionine 0.1%.

²⁾BBCE: black bean *chungkugjang* extract.

한 후 마우스의 부고환주위지방(좌/우), 내장지방(장간막지방), 복막후지방 조직을 조심스럽게 적출하여 생리식염수로 세척한 다음 여과지로 수분을 제거한 후 각각의 지방조직의 중량을 측정하였다.

통계분석

본 연구의 *in vitro* 실험결과는 3회 반복하여 실험군당 평균과 표준오차를 계산하였고, *in vivo* 실험결과는 군당 10개체씩 분석하여 평균과 표준오차를 계산하였다. SPSS (ver. 10, Statistical Package for Social Science, Chicago, IL, USA) 통계프로그램의 one-way ANOVA를 실시한 후 $p < 0.05$ 의 유의수준에서 Duncan's multiple range test에 의하여 각 실험군의 평균치 간의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

DPPH free radical 소거효과 측정

체내에서 일어나는 산화 반응은 노화의 유발과 세포의 변이를 유발하여 암세포를 생성한다. 따라서 항산화 작용은 이런 체내의 부정적인 반응을 억제하기 위한 예방 방편으로 많은 관심을 받고 있다. DPPH는 안정한 free radical로서, 항산화 물질에 의해 환원되어 탈색되므로 항산화 물질의 항산화효과를 측정할 때 많이 사용된다(21). Table 2에서와 같이 검은콩 청국장 추출물의 SC_{50} 값이 162.7 ± 2.8 ppm으로 측정되었다. Kim과 Lee(22)는 발효콩의 발효기간별 항산화효과를 측정된 결과 가장 효과가 좋았던 발효 5일째 물 추출물의 10 mg/mL의 농도에서 약 60%의 소거효능을 보인다고 보고하였으며, Park 등(23)은 발효 대두 식품의 DPPH free radical 소거능을 측정된 결과 200 mg/mL의 농도에서 된장(50.54%), 메주(18.61%), 청국장(17.08%)의 소거능을 보고한 것과 비교하였을 때 검은콩 청국장 추출물의 항산화 효과가 우수한 것으로 판단된다. 양성대조군으로 사용된 녹차카

Table 2. DPPH radical and superoxide anion radical scavenging effect of BBCE

	SC_{50} ¹⁾ (ppm)	
	DPPH free radical	Superoxide anion radical
BBCE ³⁾	$162.7 \pm 2.8^{a2)}$	205.62 ± 36.6^a
Ascorbic acid	4.2 ± 0.3^b	13.51 ± 2.7^b
EGCG ⁴⁾	1.9 ± 0.2^b	2.47 ± 0.5^c

¹⁾ SC_{50} : 50% scavenging concentration.

²⁾Values with different letters within a column differ significantly ($p < 0.05$), mean \pm SE (n=3).

³⁾BBCE: black bean *chungkugjang* extract.

⁴⁾EGCG: epigallocatechin gallate.

테킨인 EGCG는 녹차잎에서 추출한 폴리페놀의 일종으로 강력한 항산화효과를 갖고 있는 것으로 알려져 있으며, SC_{50} 값이 1.9 ± 0.2 ppm으로 측정되었고, 대표 항산화제인 ascorbic acid의 SC_{50} 값은 4.2 ± 0.3 ppm으로 나타났다. EGCG와 ascorbic acid는 항산화효과가 뛰어난 단일물질인 반면, 검은콩 청국장 추출물은 crude한 추출물이며, 보통 천연 식물 추출물중 유효성분이 1% 미만인 것을 감안하였을 때 이후 유효성분에 대한 분리 정제과정이 추가되면 효과 높은 항산화제로 사용이 가능할 것으로 보인다.

Superoxide anion radical 소거효과 측정

Superoxide anion radical 소거효과 측정은 xanthine에 xanthine oxidase가 작용하면 $\cdot O_2^-$ 가 생성되고 생성된 $\cdot O_2^-$ 는 공존하는 nitro blue tetrazolium(NBT)을 환원시켜 발색 반응을 나타내지만 생성된 $\cdot O_2^-$ 의 제거능을 가진 물질로 인하여 그 발색이 저해되는 원리를 이용하여 측정한다(24). 그 결과를 Table 2에 정리하였다. 검은콩 청국장 추출물의 superoxide anion radical 소거효과에 대한 SC_{50} 값은 205.62 ± 36.6 ppm이고, EGCG와 ascorbic acid는 각각 2.47 ± 0.5 ppm, 13.51 ± 2.7 ppm으로 나타났다. DPPH radical 소거효과 결과와 마찬가지로, 검은콩 청국장 추출물이 EGCG와 ascorbic acid와 비교했을 때는 낮은 효과를 보이지만, 유효성분에 대한 분리 정제과정이 추가되면 높은 항산화력을 보일 것으로 사료된다. 콩과 콩 발효식품에 존재하는 대표적인 항산화 물질로는 chlorogenic acid, isochlorogenic acid, caffeic acid, isoflavone, 펩타이드와 아미노산 및 갈변물질 등이 알려져 있다(25). DPPH free radical, superoxide anion radical 소거효과 측정 결과 검은콩 청국장 추출물의 항산화 효과는 검은콩에 함유되어있는 isoflavones(genistein, daidzein 등) 및 peptide와 유리 아미노산 등의 화합물들이 발효과정에서 미생물의 작용에 의해 생성된 여러 가지 성분 및 기능성 물질들과 서로 작용하여 상승효과를 일으킨 것으로 사료된다.

세포독성 측정 및 지방세포 분화 억제효과 확인

검은콩 청국장 추출물의 세포독성 범위를 분화된 3T3-L1 지방세포를 이용하여 MTT시험법에 의해 측정하였다(Fig. 1). 검은콩 청국장 추출물을 0 ppm에서 5,000 ppm 농도 범위

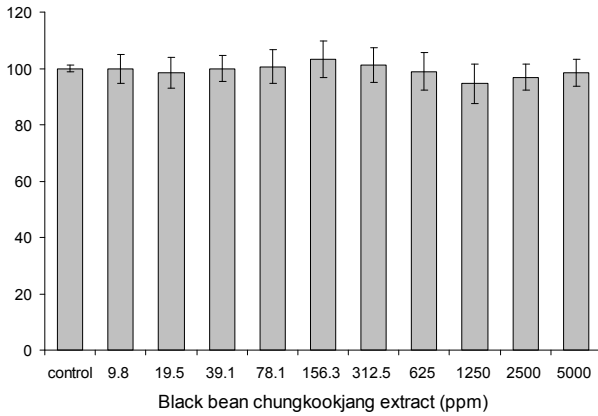


Fig. 1. Cell viability of 3T3-L1 adipocytes with treatment of black bean *chungkugjang* extract (BBCE) at various concentrations.

내에서 측정된 결과 5,000 ppm의 농도까지 세포의 성장에 영향을 주지 않았다. 따라서 이후의 실험에서는 보다 안전한 농도 범위인 4,000 ppm까지 사용하였다. 검은콩 청국장 추출물은 다른 천연물 또는 식품의 연구와 비교해 볼 때(26,27) 유효범위가 대체로 넓게 나타나고 있어 다른 천연 추출물보다 비교적 세포독성이 낮은 것으로 보인다.

지방세포 분화 억제효과를 확인하기 위하여 중성지방만을 붉은색으로 염색하는 Oil Red O 염색법을 통해 3T3-L1 지방세포 내 생성된 중성지방의 양을 측정하였다. 중성지방은 1분자의 글리세롤에 3분자의 지방산이 에스테르 결합한 것으로서 음식물로 섭취하는 지방의 95% 이상이 중성지방이며, 동물의 저장지방의 경우 중성지방 형태로 저장된다(28,29). 분화된 3T3-L1 지방세포에 검은콩 청국장 추출물을 0, 500, 1,000, 2,000, 4,000 ppm으로 처리한 후 생성된 중성지방을 Oil Red O 시약으로 염색한 결과 1,000, 2,000, 4,000 ppm의 농도에서 각각 9.5, 12.9, 17.1%의 감소를 나타내었으나, 500 ppm의 비교적 낮은 농도 처리하였을 때는 대조군과

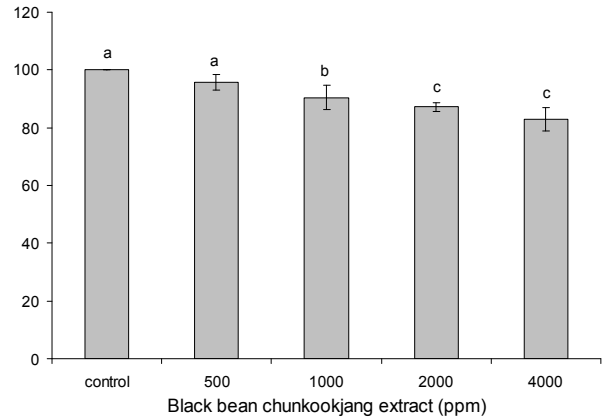


Fig. 2. Effect of black bean *chungkugjang* extract (BBCE) on the lipid content in 3T3-L1 adipocytes. The intracellular lipid accumulation was quantified by Oil Red O staining. Data are expressed as mean \pm SE (n=3). Values with different superscript letters are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

비교하여 유의적인 차이가 없었다(Fig. 2). 이 결과는 현미경적 관찰에서도 동일한 결과로 확인되었다(Fig. 3). Kim 등(30)의 연구에서 청국장에서 분리한 *Bacillus subtilis*로 발효시킨 두유의 중성지방 축적 정도를 측정된 결과 1 mg/mL의 농도로 3T3-L1 지방세포에 처리했을 때 약 19% 감소결과를 보였다. 이 결과를 통해 검은콩 청국장 추출물이 3T3-L1 지방세포 내 중성지방의 생성 및 축적 억제효과가 큰 것으로 나타났으므로 비만 예방에 효과적일 것으로 기대된다.

체중변화, 식이섭취량 및 식이효율

실험동물을 고지방식으로 비만을 유도하며 검은콩 청국장 추출물을 투여하였다. 고지방식으로 7주간 비만을 유도한 결과 체중증가는 Table 3에서와 같이 HFD군이 13.04 \pm 2.94 g 증가한 반면 ND군은 10.28 \pm 1.61 g 증가하여 고지방식이 공급으로 체중이 현저히 증가함을 알 수 있었다. 고지

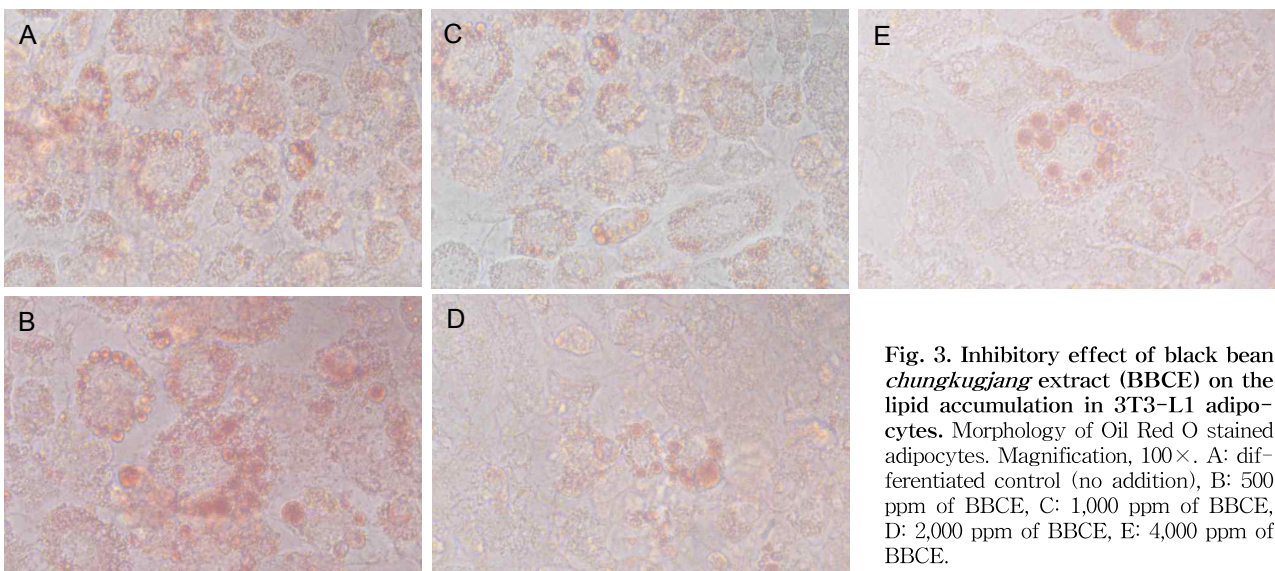


Fig. 3. Inhibitory effect of black bean *chungkugjang* extract (BBCE) on the lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. Morphology of Oil Red O stained adipocytes. Magnification, 100 \times . A: differentiated control (no addition), B: 500 ppm of BBCE, C: 1,000 ppm of BBCE, D: 2,000 ppm of BBCE, E: 4,000 ppm of BBCE.

Table 3. Changes in body weight, food intake and food efficiency ratio of mice fed high fat diet containing BBCE of 7 weeks

Group	Initial weight (g)	Final weight (g)	Weight gain (g)	Food intake (g/day)	Food efficiency ratio (%) ¹⁾
ND	30.33±0.30 ^{NS3)}	40.61±0.55 ^{b4)}	10.28±1.61 ^b	3.36±0.43 ^a	5.46±0.54 ^b
HFD	29.20±0.38	42.24±0.61 ^a	13.04±2.94 ^a	3.26±0.37 ^b	7.18±0.67 ^a
HFD-BBCE ²⁾	29.64±0.41	40.31±0.54 ^b	10.66±2.40 ^b	3.43±0.47 ^a	5.41±0.49 ^b

¹⁾Food efficiency ratio (%): (weight gain/amount food intake)×100

²⁾BBCE: black bean *chungkugjang* extract

³⁾NS: not significant

⁴⁾Values with different letters within a column differ significantly ($p<0.05$), mean±SE (n=10).

Table 4. Effect of BBCE on serum lipid levels in mice fed high fat diet

Group	Concentration (mg/dL)			
	TC ¹⁾	TG ²⁾	HDL-C ³⁾	LDL-C ⁴⁾
ND	178.92±5.19 ^{b6)}	68.55±4.78 ^c	97.55±9.2 ^b	47.95±2.22 ^c
HFD	209.88±4.60 ^a	95.40±2.43 ^a	115.82±9.2 ^a	79.55±3.59 ^a
HFD-BBCE ⁵⁾	192.97±4.41 ^b	70.49±2.32 ^b	104.13±12.4 ^{ab}	71.62±2.65 ^b

¹⁾TC: total cholesterol. ²⁾TG: triglyceride. ³⁾HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol.

⁴⁾LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol. ⁵⁾BBCE: black bean *chungkugjang* extract

⁶⁾Values with different letters within a column differ significantly ($p<0.05$), mean±SE (n=10).

방식이 5% 검은콩 청국장 추출물 분말을 급여한 HFD-BBCE군에서는 7주 후에 10.66±2.40 g의 체중이 증가하여 ND군과 유사한 수준으로 낮은 체중증가량을 나타내었다 ($p<0.05$).

식이섭취량은 HFD군이 ND군에 비해 섭취량이 적은 반면 식이효율은 높게 나타났는데, 이는 고지방식의 칼로리가 높아서 나타난 현상인 것으로 보인다. 일일섭취량은 HFD군 3.26±0.37 g에 비하여 ND군은 3.36±0.43 g, HFD-BBCE군은 3.43±0.47 g으로 다소 증가하는 결과를 나타내었다. 이는 고지방식의 식이지방이 공복감을 줄여 식이섭취량을 감소시키고, 열량 밀도가 높을수록 식이 섭취량이 감소되기 때문이다(29). 1일 체중증가량을 1일 식이섭취량으로 나눈 후 계산한 식이효율은 ND군이 5.46±0.54%를 나타내었고, HFD-BBCE군이 5.41±0.49%로 HFD군 7.18±0.67%에 비하여 24.65% 정도로 낮은 수준의 식이효율을 나타내어 BBCE군의 체중증가량이 적게 나타난 것으로 보인다.

혈청 지질 농도 및 렙틴 농도 측정

검은콩 청국장 추출물을 7주간 급여한 후 혈청 지질 농도에 미치는 영향은 Table 4에서와 같다. 혈청 중의 총 콜레스테롤과 중성지방 함량은 ND군에 비하여 HFD군에서 유의적으로 높았다. 중성지방의 농도는 ND군의 경우 68.55±4.78 mg/dL이었다. HFD군은 95.40±2.43 mg/dL로 ND군과 비교하여 유의적으로 증가하였고, HFD-BBCE군은 70.49±2.32 mg/dL로 HFD군의 73.8% 수준으로 현저히 저하됨을 보였다. Park 등(31)과 Wat 등(32)은 고지방식이 급여가 ND군과 비교하여 혈중 중성지방과 총 콜레스테롤 함량을 증가시킨다고 보고하였는데 이는 본 연구결과와 일치하였다. 총 콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 농도는 ND군에 비하여 HFD군에서 증가하였고, 고지방식이와 함께 검은콩 청국장

추출물을 급여한 HFD-BBCE군은 다소 감소하는 경향으로 통계적으로 유의성 있게 나타났다($p<0.05$). LDL-콜레스테롤이 동맥경화반 형성에 중요한 원인으로 작용하는 것이 밝혀져 있으므로, 동맥경화증의 위험인자로서는 총 콜레스테롤 수치보다 LDL-콜레스테롤이 더 중요하다(33,34). HDL-콜레스테롤 함량을 측정 결과 ND군의 경우 97.55±9.2 mg/dL이며, HFD군과 HFD-BBCE군의 경우 각각 115.82±9.2 mg/dL와 104.13±12.4 mg/dL로 측정되었으며, 이렇게 측정된 총 콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤 함량을 통해 LDL-콜레스테롤 함량을 계산한 결과에서 LDL-콜레스테롤 함량도 고지방식이군에 비하여 BBCE군이 유의적으로 감소함을 볼 수 있었다. 혈중 지질 함량 감소는 관상심혈관계 질환의 위험을 감소시킨다는 연구결과들(31-33)에 근거하여 검은콩 청국장 추출물의 섭취는 비만에 의해 유발되는 심혈관계의 위험성을 줄여 줄 것으로 추정된다.

검은콩 청국장 추출물의 급여에 따른 혈청 내 렙틴의 양을 측정하였다(Fig. 4). 렙틴은 지방세포에서 주로 분비되는 단백질로서 중추신경계에 작용하여 식욕을 억제하고 에너지 소비를 촉진시키며 에너지 항상성을 유지시키는 호르몬이다(35,36). 비만인은 혈중 렙틴의 농도가 정상인에 비해 높으며 *in vitro*에서도 지방세포의 지방축적에 비례하여 렙틴의 분비가 증가하게 된다고 알려져 있다(37). Kim 등(38)은 5주간 고지방식이 유도 비만 흰쥐에 200 mg/kg 홍삼 조사포닌을 3주간 투여하였을 때의 효과를 연구한 실험에서 체중, 식이섭취량 감소와 식욕조절 관련 시상하부의 neuropeptide Y 발현과 혈중 렙틴 양의 감소를 보고하였다. 이와 같이 렙틴은 비만을 평가하는 척도로 사용되고 있다. 일반식을 섭취한 ND군의 경우 혈청 내 렙틴의 농도는 331.75±30.49 pg/mL이며, 고지방식을 섭취한 HFD군의 경우 480.65±

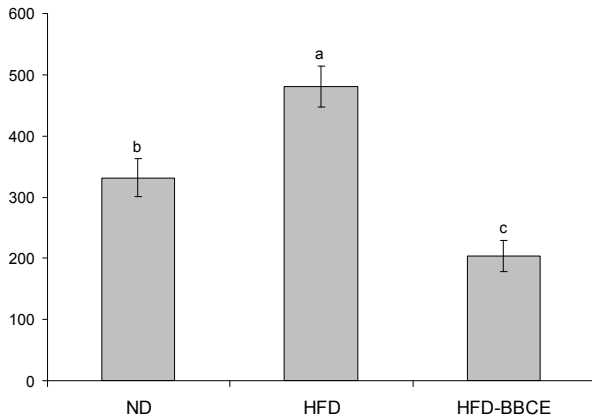


Fig. 4. Concentration of serum leptin in mice fed high-fat diets containing black bean *chungkugjang* extract (BBCE). Results represent the mean±SE (n=10). Values with different superscript letters are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

33.29 pg/mL로 측정되어 고지방식이 섭취에 의해 비만이 유도되었음을 알 수 있다. 고지방식이를 섭취하면서 검은콩 청국장 추출물 분말을 함께 급여한 HFD-BBCE군의 경우 렙틴 농도가 203.61±25.32 pg/mL로 렙틴의 농도가 확연히 감소되는 것을 확인함으로써 검은콩 청국장 추출물에 의해 비만도가 감소되었음을 유추할 수 있다.

지방조직의 무게

비만은 체중의 증가보다는 체지방의 증가, 특히 피하지방보다는 복강 내에 위치한 지방조직의 증가가 건강상의 위해 요인으로 작용한다고 알려져 있다(39,40). Despres(41)도 체지방 함량이 동일하더라도 복부지방 함량이 증가할수록 대사성 합병증이 증가한다고 보고하였다. 실험동물에서 적출한 부고환주위지방(좌/우), 장간막 지방, 복막후지방량은 Fig. 5와 같다. 다른 연구결과들을 보면 에너지 섭취량보다는 식이조성 특히 지방의 섭취비율이 체지방 축적에 더 영향을 미친다고 보고되었다(37). 본 연구결과에서도 부고환주위 지방량은 HFD군에서 1.12±0.17 g/mice로 ND군의 0.93±0.08 g/mice에 비하여 약 20% 증가하므로 식이 중 지방으로부터 에너지 섭취비율이 높았던 HFD군이 ND군에 비하여 부고환주위지방의 무게가 증가된 결과를 나타낸 것으로 보인다. 이 결과는 복막후지방조직의 무게에서 역시 같은 결과를 보인다. 그러나 고지방식이에 의하여 증가된 지방조직의 무게는 검은콩 청국장 추출물 분말 급여로 부고환주위 지방의 경우 0.73±0.14 g/mice로 HFD군의 65.2% 수준으로 유의성 있게 감소되었고, 복막후지방의 경우에도 유의성 있게 감소된 결과를 나타내었다. 장간막지방의 경우 ND군과 HFD군이 각각 0.79±0.06 g/mice와 0.71±0.12 g/mice로 유의적인 차이를 보이지 않았지만, 검은콩 청국장 추출물을 급여한 HFD-BBCE군의 경우는 0.66±0.08 g/mice로 감소하였다. Table 5에서와 같이 총 지방량으로 비교했을 때 검은콩 청국장 추출물의 급여에 의한 지방 감소가 더욱 뚜렷하

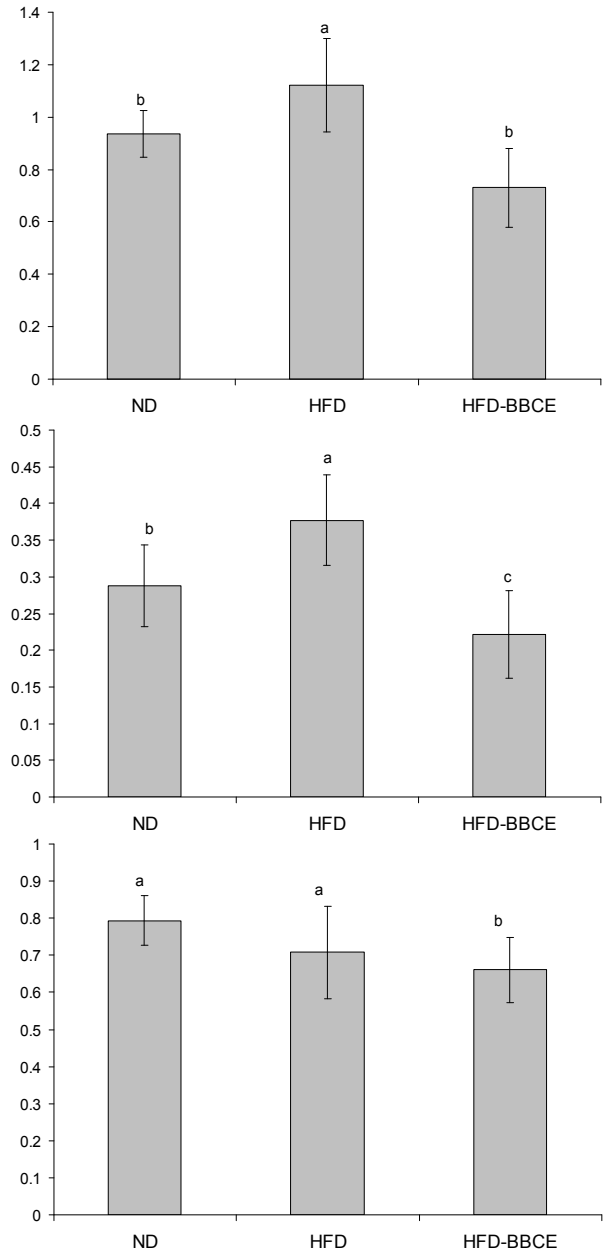


Fig. 5. Changes in white adipose tissue weights of mice fed high-fat diet containing black bean *chungkugjang* extract (BBCE) for 7 weeks. Results represent the mean±SE (n=10). Values with different superscript letters are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

Table 5. Effect of BBCE on white adipose tissue weight in mice fed high fat diet

Group	White adipose tissue weight ¹⁾ (g/mice)
ND	2.01±0.20 ^{b3)}
HFD	2.21±0.35 ^a
HFD-BBCE ²⁾	1.61±0.33 ^c

¹⁾White adipose tissue: epididymal, mesenteric and retroperitoneal white adipose tissue.

²⁾BBCE: black bean *chungkugjang* extract.

³⁾Values with different letters within a column differ significantly (p<0.05), mean±SE (n=10).

게 나타나고 있음을 확인하였다($p < 0.05$). 따라서 검은콩 청국장 추출물을 급여하였을 때 체지방 축적을 대표하는 부고환·위지방과 복막후지방의 양이 유의적으로 감소하는 것을 확인함으로써 검은콩 청국장 추출물이 체지방량 감소에 매우 효과적인 소재임을 알 수 있었고, 이것은 체중 증가 억제 효과와 일치하였다. 본 연구결과 체지방 축적을 대표하는 부고환, 장간막 및 복막후 지방조직의 축적이 고지방식이로 증가되었으나 검은콩 청국장 추출물 급여로 감소되는 결과를 보이므로 검은콩 청국장 추출물이 복부비만억제효과와 더불어 대사성질환 예방효과도 어느 정도 있을 것으로 사료된다.

이상의 실험 결과 고지방식이와 함께 급여한 검은콩 청국장 추출물은 체중 및 지방조직의 무게 감소와 더불어 혈청 내 지질대사 개선에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 나타났다. 즉 검은콩 청국장 추출물은 지질대사를 개선시키고 지방 축적을 억제하여 고지혈증의 예방 및 치료효과와 비만억제 효과를 나타내어 대사성 합병증과 심혈관계 질환의 발생을 감소시키는데 효과가 있을 것으로 사료된다. 그 외에 어떠한 생리활성 성분이 어떻게 작용하는지에 대해서는 추후 더 체계적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

본 연구에서는 일반적으로 청국장에 사용하는 대두보다 많은 양의 isoflavone과 같은 생리활성 물질을 함유하고 있는 검은콩을 이용하여 청국장을 제조하였으며, 이를 추출·농축 하여 청국장이 갖는 생리활성 효과를 극대화 하였다. 이렇게 제조한 검은콩 청국장 추출물의 항산화 효과를 측정하여 확인한 결과 DPPH free radical 소거효과와 superoxide radical 소거효과를 SC_{50} 값으로 나타내었을 때 각각 162.7 ± 2.8 ppm와 205.62 ± 3.6 ppm으로 나타났다. 지방세포 분화 억제 효과를 확인하기 위하여 검은콩 청국장 추출물을 3T3-L1 지방세포에 처리하였다. 검은콩 청국장 추출물 처리에 의하여 세포독성은 나타나지 않았고 Oil Red O 염색을 통해 지방세포 내 중성지방의 양을 측정된 결과 검은콩 청국장 추출물 4,000 ppm 처리 시 최대 17.1%의 지방 감소를 보여 지방세포 분화 억제 효과를 확인하였다. 고지방식이에 의해 유도된 비만 마우스의 몸무게, 지방조직 무게(부고환, 복막후, 장간막 지방) 및 혈청 지질 농도와 렙틴 농도에 검은콩 청국장 추출물이 어떤 영향을 미치는지 연구하기 위하여 ICR 마우스에 일반식을 급여한 일반식이군(ND), 고지방식을 급여한 고지방식이군(HFD)과 고지방식에 검은콩 청국장 추출물 분말 5%를 급여한 군(HFC-BBCE군)으로 나누어 7주간 실험하였다. 고지방식이군은 일반식이군과 비교하여 혈청 지질 수준, 몸무게, 지방조직 무게가 현저하게 증가하였다. 반면 검은콩 청국장 추출물을 함유하고 있는 식이에 의해 몸무게, 지방조직 무게 및 혈중 총 콜레스테롤,

LDL-콜레스테롤 그리고 중성지방이 고지방 식이와 비교하여 현저하게 감소된 것을 확인하였다. 결론적으로 검은콩 청국장 추출물은 지방세포의 분화를 억제시키며, 고지방식이 급여로 증가된 체중 및 지방조직 무게를 감소시키고, 혈청 지질 조성을 개선시키는데 긍정적인 영향을 나타냄을 볼 수 있다. 앞으로 검은콩 청국장 추출물이 항비만 생리활성을 나타내는 새로운 기능성식품 신소재로서 개발 가능성이 있을 것으로 사료된다.

문 헌

1. Choi JW, Lee CK, Lee YC, Moon YI, Park HJ, Han YN. 2002. Biological activities of the extracts from fruit and stem of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* var. saboten) II. *Kor J Pharmacogn* 33: 230-237.
2. Kopelman PG. 1994. Causes and consequences of obesity. *Med Int* 22: 385-388.
3. Lee JJ, Lee DS, Kim HB. 1999. Fermentation patterns of *chungkookjang* and *kanjang* by *Bacillus licheniformis* B1. *Kor J Microbiol* 35: 269-301.
4. Hwang JS, Kim SJ, Kim HB. 2009. Antioxidant and blood-pressure reduction effects of fermented soybean, chungkookjang. *Kor J Microbiol* 45: 54-57.
5. Choi UK, Ji WD, Chung YG. 1998. Characteristics of *Chunggugjang* produced by *Bacillus subtilis* DC-2. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 846-851.
6. Sumi H, Hamada H, Nakanishi K, Hiratani H. 1990. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta Haematol* 84: 139-143.
7. Okamoto A, Hanagata H, Kawamura Y, Yanagida F. 1995. Anti-hypertensive substances in fermented soybean, natto. *Plant Foods Hum Nutr* 47: 39-47.
8. Kim SH, Yang JL, Song YS. 1999. Physiological functions of *Chungkukjang*. *Food Ind Nutr* 4: 40-46.
9. Lee JO, Ha SD, Kim AJ, Yuh CS, Bang IS, Park SH. 2005. Industrial application and physiological function of *Chungkukjang*. *Food Sci Ind* 38: 69-78.
10. Seo JH, Kim SC, Lee SP. 2008. Physicochemical properties of poly- γ -glutamic acid produced by a novel *Bacillus subtilis* HA isolated from *Cheonggukjang*. *J Food Sci Nutr* 13: 354-361.
11. Kim JE, Lee SP. 2010. Evaluation of radical scavenging activity and physical properties of textured vegetable protein fermented by solid culture with *Bacillus subtilis* HA according to fermentation time. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 872-879.
12. Record IR, Dreosit IE, McInerney JK. 1995. The antioxidant activity of genistein in vitro. *J Nutr Biochem* 6: 481-485.
13. Wei H, Cai Q, Rahn R. 1996. Inhibition of UV light and fenton reaction-induced oxidative DNA damage by the soybean isoflavone genistein. *Carcinogenesis* 17: 73-78.
14. Shon MY, Kwon SH, Sung CK, Lee SW, Park SK. 2001. Isolation and microbiological characteristics of *Bacillus megaterium* SMY-212 for preparation of black bean *Chungkugjang*. *J Life Sci* 11: 304-310.
15. Yasushi S, Tsukase N, Keiko S, Hiroe Y, Hisashi Y. 1999. Stopped-flow and spectrophotometric study on radical scavenging by tea catechins and model compound. *Chem Pharm Bull* 47: 1369-1374.
16. Okamura H, Mimura A, Yakou Y, Niwano M, Takahara Y. 1993. Antioxidant activity of tannins and flavonoids in

- Eucalyptus rostrata*. *Phytochemistry* 33: 557-561.
17. Mac Dougald OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD. 1995. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 20: 9034-9037.
 18. Sladowski D, Steer SJ, Clothier RH, Balls M. 1993. An improved MTT assay. *J Immunol Methods* 157: 203-207.
 19. Green H, Kehinde O. 1975. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 5: 19-27.
 20. Friedewald W, Levy R, Fredrickson D. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18: 499-502.
 21. Ramarathnam N, Osawa T, Ochi H, Kawakishi S. 1995. The contribution of plant food antioxidants to human health trends. *Food Sci Technol* 6: 75-82.
 22. Kim JE, Lee SP. 2009. Production of bioactive components and anti-oxidative activity of soybean grit fermented with *Bacillus subtilis* HA according to fermentation time. *Korean J Food Sci Technol* 41: 179-185.
 23. Park JW, Lee YJ, Yoon S. 2007. Total flavonoids and phenolics in fermented soy products and their effects on anti-oxidant activities determined by different assays. *Korean J Food Culture* 22: 353-358.
 24. Kim KB, Yoo KH, Park HY, Jeong JM. 2006. Anti-oxidative activities of commercial edible plant extracts distributed in Korea. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 49: 328-333.
 25. Lee JJ, Cho CH, Kim JY, Kee DS, Kim HB. 2001. Antioxidant activity of substances extracted by alcohol from chungkukjang powder. *Korean J Microbiol* 37: 177-181.
 26. Kim DH, An BJ, Kim SG, P TS, Park GH, Son JH. 2011. Anti-inflammatory effect of *Ligularia fischeri*, *Solidago virga-aurea* and *Aruncus dioicus* complex extracts in Raw 264.7 cells. *J Life Science* 21: 678-683.
 27. Lee SY, Kim HJ, Choi SW. 2011. Study on the antioxidant activity of *Geranium nepalense* subsp. thunbergii extract. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 37: 61-66.
 28. Chen HC, Farese J. 2000. DGAT and triglyceride synthesis: a new target for obesity treatment? *Trends Cardiovasc Med* 10: 188-192.
 29. Duane WC. 1997. Cholesterol metabolism in familial hypertriglyceridemia: effects of obesity versus triglyceride level. *J Lab Clin Med* 130: 635-642.
 30. Kim JY, Jeong JE, Moon SH, Park KY. 2010. Antiobesity effect of the *Bacillus subtilis* KC-3 fermented soymilk in 3T3-L1 adipocytes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1126-1131.
 31. Park SH, Ko SK, Chung SH. 2005. *Euonymus alatus* prevents the hyperglycemia and hyperlipidemia induced by high-fat in ICR mice. *J Ethnopharmacol* 102: 326-335.
 32. Wat E, Tandy S, Kapera E, Kamili A, Chung RWS, Brown A, Brown A, Rowney M, Cohn JS. 2009. Dietary phospholipid-rich dairy milk extract reduces hepatomegaly, hepatic steatosis and hyperlipidemia in mice fed a high fat diet. *Atherosclerosis* 205: 144-150.
 33. Gotto AM Jr, Farmer JA. 2006. Drug insight: The role of statins in combination with ezetimibe to lower LDL-cholesterol. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3: 664-672.
 34. Lee KS, Kim JB. 2009. Effects of the *Sarcodon aspralus* on the high level of blood lipid and obesity induced by high fat-diet in rat. *J Life Science* 19: 1265-1270.
 35. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. 1995. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269: 546-549.
 36. Palous A, Serra F, Bonet ML, Pico C. 2000. Obesity: molecular bases of a multifactorial problem. *Eur J Nutr* 3: 127-144.
 37. Miller WC, Lindeman AK, Wallace J, Niederpruem M. 1990. Diet composition, energy intake, and exercise in relation to body fat in men and women. *Am J Clin Nutr* 52: 426-430.
 38. Kim JH, Hahm DH, Yang DC, Kim JH, Lee HJ, Shim I. 2005. Effect of crude saponin of Korean red ginseng on high-fat diet-induced obesity in the rat. *J Pharmacol Sci* 97: 124-131.
 39. Bjorntorp P. 1988. The associations between obesity, adipose tissue distribution and disease. *Acta Med Scand* 723: 121-134.
 40. Bjorntorp P. 1990. "Portal" adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Atherosclerosis* 10: 493-496.
 41. Despres JP. 1993. Abdominal obesity as important component of insulin-resistant syndrome. *Nutrition* 19: 452-469.

(2011년 8월 17일 접수; 2011년 9월 5일 채택)